探究DEN诱导大鼠肝癌-炎癌模型中尿液蛋白质组的变化

王云龙[1] 高友鹤*

（北京师范大学基因工程药物及生物技术北京市重点实验室 北京 100871）

摘要：

[目的]通过DEN诱导的肝癌-炎癌模型，观察疾病不同阶段尿液蛋白质组动态变化过程。

[方法]本研究腹腔注射DEN构建大鼠肝癌-炎癌模型，每周收集尿液，通过液相色谱联用质谱（LC-MS/MS）鉴定差异蛋白，使用IPA软件对差异蛋白进行生物学通路的分析，观察大鼠肝癌-炎癌模型中疾病不同阶段尿蛋白变化情况。

[结果]15只实验大鼠通过DEN诱导，构建了从肝炎-肝硬化-肝癌疾病模型的不同时期，并且每只大鼠由于个体差异出现了疾病进展快慢不同的现象。每只大鼠在不同疾病时间点都出现了较多的差异蛋白，不同大鼠的差异蛋白都富集到了相同的与肝脏损伤、炎症病变有关、与肿瘤的发生有关、与肿瘤潜在的治疗靶点有关的生物学通路。

[讨论]我们可以在肝癌-炎癌模型各阶段观察到尿液蛋白质组不同的变化，并且不同大鼠由于个体差异会出现疾病进展不同的现象，这提示我们之后需要更加注意检测的个体化、精准化。

关键词：蛋白质组学；尿液；炎癌模型；肝癌

To explore the changes of the urinary proteome in DEN induced liver cancer-inflammatory cancer model in rats

Wang Yunlong [1] Gao Youhe*

(Gene Engineering Drug and Biotechnology Beijing Key Laboratory, Beijing Normal University, Beijing 100871, China)

Abstract:

[Objective] Through the liver cancer-inflammatory cancer model induced by DEN, observe the dynamic change process of urine proteome at different stages of the disease.

[Methods] In this study, a rat liver cancer-inflammatory cancer model was constructed by intraperitoneal injection of DEN, urine was collected weekly, and differential proteins were identified by liquid chromatography coupled with mass spectrometry (LC-MS/MS), and the biological pathways of differential proteins were analyzed using IPA software. To observe the changes in urine protein at different stages of the disease in the rat liver cancer-inflammatory cancer model.

[Results] Fifteen experimental rats were induced by DEN to construct different stages of the hepatitis-cirrhosis-liver cancer disease model, and each rat had a different disease progression due to individual differences. Each rat has more differential proteins at different disease time points. The differential proteins of different rats are enriched in the same biological pathways related to liver injury, inflammatory lesions, tumor occurrence, and potential therapeutic targets of the tumor.

[Discussion] We can observe different changes of urine proteome in each stage of the liver cancer inflammatory cancer model, and different rats will have different disease progression due to individual differences, which suggests that we need to pay more attention to the individualization and accuracy of detection in the future.

Keywords: Proteomics; Urine; Inflammatory cancer model; Liver cancer

1 引言

尿液是经血液过滤后形成的代谢废物，不受稳态机制的调节，能够富集机体为维持稳态而排出的各种变化。因此，尿液比血液更快、更灵敏地反映机体的变化，是挖掘早期疾病标志物的重要来源[1, 2]。在已有的研究中，肺纤维化[3]、星状细胞瘤[3]、胰腺癌[4]、膀胱癌[5]等，都在尿液中发现了明显的差异蛋白。此外，尿液还具有无创、大量、连续收集的优点。因此，我们认为尿液是寻找生物标志物良好的生物学来源。使用动物模型，可以排除大量复杂因素的影响，将影响因素降到最低[6]。通过二乙基亚硝胺（DEN）诱导动物肝癌的发生，不同于以往的接种癌细胞的直接肝癌造模，炎癌模型模拟了人类从肝炎到肝硬化到肝癌的一步步进程，所以对于寻找人的肝癌早期标志物具有更加重要的实用意义。

肝癌是非常常见的一种恶性肿瘤，其发病过程隐匿，病程时间短，发病率和死亡率却相对较高[7]。在世界各国，肝癌均有发生，每年发病人数可达 62.6 万，死亡人数高达 58.9 万，是居全球第六位的常见肿瘤，并且在肿瘤死亡率中高居第三[8]。这说明了肝癌严重威胁着人类的健康和生命。我国是肝癌的高发病率国家之一，每年大约有 10 万余人死于原发性肝癌。全球 80%的肝癌的发生，与感染引起的隐匿性肝炎及慢性病毒性肝炎，由此导致的肝脏炎性反应、肝纤维化及肝脏再生结节直接相关[9]。因此，早诊断、早治疗，对提高肝癌患者的生存至关重要。作为死亡率排名第三的癌症，由于目前尚没有有效的治疗措施，如何有效的预防肝癌的发生成了现在的一大难题。

二乙基亚硝胺作为一种亚硝胺类，不仅是一种强化学致癌物，而且是生活中非常容易见到的食品污染物之一，食物、化妆品、啤酒、香烟中都含有亚硝胺。我们通过二乙基亚硝胺诱导肝癌模型的方式，可以确定动物肝癌以及癌前病变各个阶段的发病时间，是一种可靠的诱癌生物模型。

本研究中，我们构建大鼠的肝癌-炎癌模型，每周收集尿液。并分别在不同时间节点进行取血、取组织，分别通过血液的生化指标和肝脏组织的 HE 切片来确定大鼠的病理进程。将收集到的尿液进行质谱分析，探究病情进展过程中尿液蛋白质组的变化以及相关生物学通路的变化，为肝癌的临床诊断乃至治疗靶点的寻找提供线索和依据。

2 材料与方法

2.1 实验动物及模型构建

20 只 180g 的雄性 Wistar 大鼠购自北京维通利华实验动物技术有限公司，按照 50mg/kg 的剂量每周对大鼠进行二乙基亚硝胺（DEN）腹腔注射，期间按照 12 小时正常光暗循环、温度为(22℃±1℃)、湿度为(65%－70%)的标准条件进行饲养。每周进行一次尿液收集，在注射前（第 0 周）和注射后第 4、12、16、18 周对大鼠进行取血肝功检测和取肝脏组织 HE 切片判断模型进展情况。所有实验操作符合动物伦理审查标准。动物许可证为 SCXK（京）2016-0006。所有实验均经北京协和医学院基础医学研究所机构动物护理使用与福利委员会批准（动物福利保障编号：ACUC-A02-2014-007）

2.2 血生化检测

为方便判断大鼠肝癌-炎癌模型的进展情况以及炎癌模型各个阶段的血液变化情况，我们分别在二乙基亚硝胺腹腔注射之前（第0周）和注射后第4周、第12周、第16周、第18周，用2%的戊巴比妥钠按照0.2ml/100g的剂量腹腔注射麻醉大鼠，腹主动脉取血2ml。全血按照3000rpm，10min，4℃的条件离心取血清。测定血清中谷丙转氨酶（ALT）、谷草转氨酶（AST）、碱性磷酸酶（ALP）、总蛋白（TP）、白蛋白（ALB）的变化情况。

2.3 组织病理切片

对腹主动脉取血之后的wistar大鼠进行心脏灌注处理。从左心尖部位进针到主动脉，快速灌注生理盐水，同时在右心耳处剪一个小口，大概灌注生理盐水60ml之后，流出液体变为无色，开始改换4%多聚甲醛。对灌注完成的大鼠，取肝脏观察肝脏大体情况。之后，取肝脏组织进行HE切片，通过Image Scope软件观察病理切片，判断大鼠肝癌-炎癌模型的病情进展情况。

2.4 尿液收集及样品处理

（1） 尿液收集

我们每周对大鼠进行二乙基亚硝胺腹腔注射和尿液收集，为尽量避免药物本身对于尿蛋白的影响。我们在每次腹腔注射6天以后，下一次腹腔注射之前，收集该次的尿液。每只大鼠在代谢笼中过夜收集尿液10小时，期间不提供水和食物。第二天早上将收集到的尿液立即放置于-80℃条件下进行保存，等待后续实验。

（2） 尿蛋白提取和酶切

尿蛋白提取：尿液按照12000g，40min，4℃的条件离心取上清；将上清液每管500ul转移到新的EP管里，按照上清：乙醇=1：3的比例加入预冷乙醇，搅拌均匀；在-20℃条件下过夜12h；第二天将溶液混匀，按照12000g，30 min，4℃条件离心弃上清、留沉淀，倒扣滤纸，吹风机冷风吹干；加入裂解液37.5ul,用枪头吹匀直到无沉淀为止，按照12000g，30 min，4℃条件离心，取上清液，放入新EP管中分装、-80℃条件保存。复溶后，采用Bradford 法测定蛋白质浓度。

尿蛋白酶切：使用FASP方法进行尿蛋白酶解[10]。100ug尿蛋白加入到10kD超滤管（Pall, Port Washington, NY, USA）的滤膜上，使用UA溶液（8mol/L尿素，0.1mol/L Tris-HCl,pH8.5）和25 mmol/L NH_4HCO_3溶液分别洗涤两次，按照胰酶：蛋白为1：50的比例加入胰蛋白酶（Trypsin Gold,Promega，Fitchburg, WI,USA）进行消化，37℃水浴过夜。过夜后离心收集多肽通过HLB固相萃取柱（Waters,Milford,MA）进行除盐处理，用真空干燥抽干，存入-80℃保存。

（3） LC-MS/MS串联质谱分析

酶切后的样品0.1%甲酸水复溶，并稀释到0.5μg/μL，取每个样品制备混合多肽样，使用高pH反相肽段分离试剂盒(Thermo Fisher Scientific)进行分离。将混合多肽样品加于色谱柱上，用乙腈浓度梯度递增的溶液进行洗脱，通过离心收集十份流出液，使用真空干燥仪抽干后用0.1%甲酸水复溶。使用iRT合成多肽（Biognosis 公司），以10：1的体积比例加入到十个组分和每个样品中。使用EASY-nLC 1200超高效液相色谱串联Orbitrap Fusion Lumos高分辨质谱仪对10个分级组分进行数据采集。将溶于0.1%甲酸水中的肽段装载至预柱（75

μm×2cm， 3μm， C18， 100A°），将洗脱液装载至反相分析柱

（50μm×250mm，2μm，C18，100A°），洗脱梯度 4%-35%流动相 B（80%乙腈+0.1%甲酸+20%水，流速为 300nL/min），90min。为实现全自动、灵敏的信号处理，在所有样品中使用校准试剂盒（iRT kit,Biognosys,Switzerland），浓度为 1:20v/v。以 DDA-MS 模式分析 10 个组分，参数设置如下：喷雾电压 2.4kV，Orbitrap 的一级分辨率为 60000、扫描范围为350-1550m/z，二级扫描范围为200-2000m/z，分辨率为 30000，筛选窗口为2Da，碰撞能量为30% HCD）。AGC 目标为5e4，最大进样时间为30ms。raw 文件通过 PD（Proteome Discoverer 2.1，Thermo Fisher Scientific 公司）软件建库和分析。

（4） 质谱数据处理

将PD搜库结果用于建立DIA采集方法，根据m/z分布密度计算窗口宽度和数量。将单个多肽样品进行DIA模式采集质谱数据。使用Spectronaut X 软件对质谱数据进行处理和分析。导入每个样本DIA采集的raw文件进行搜库。高度可信蛋白标准为肽段q value<0.01，采用二级肽段所有碎片离子峰面积进行蛋白定量。

（5） 统计学分析

对质谱鉴定结果进行缺失值填充（KNN 方法）[11]和CV值筛选（CV<0.3）[12]，每两组数据之间的比较采用独立样本t检验。为尽量减少大鼠生长发育本身对于尿蛋白的影响，我们采用相邻时间点的比较方法，即第4周与第0周比较、第8周与第4周比较、第12周与第8周比较、第16周与第12周比较、第18周与第16周比较的方法，筛选差异蛋白标准为：两组之间变化倍数 FC≥1.5 或 FC≤0.67，P<0.05。

（6） 差异蛋白功能注释

将筛选到的差异蛋白用DAVID数据库（https://david.ncifcrf.gov/）[13]和 IPA软件(Ingenuity Systems, Mountain View, CA, USA)进行功能富集分析，均采用P<0.05的显著性阈值。

3 实验结果

3.1 大鼠体重变化

为大体确定模型进展情况，我们对 15 只肝癌-炎癌模型的wistar大鼠的体重状况每周进行了记录。大鼠的体重变化规律符合我们的预期。在腹腔注射大概8-9周后，伴随着肝炎病情的加重，大鼠的体重在这一阶段出现了放缓的趋势。并且在腹腔注射大概15周左右，大鼠的体重变化出现了下降的趋势，这也跟之后我们的组织病理学结果相对应，在这一阶段，大鼠病情已经进展到了肝癌阶段。（见图1）

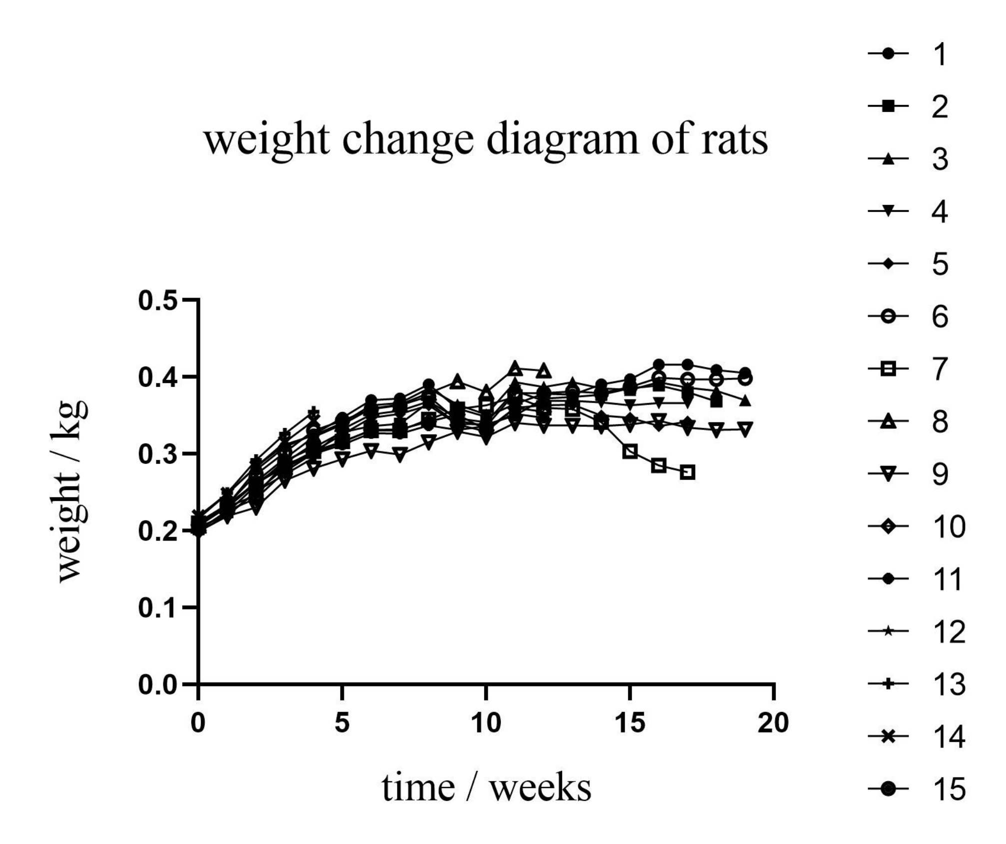


Figure 1. 大鼠体重变化图

3.2 血生化结果分析

血生化结果显示了肝癌-炎癌模型过程中，血液中肝功五项的变化结果。谷丙转氨酶（ALT）受肝细胞膜通透性的影响，一般与急性乙肝和慢性肝硬化有关。如图 2a 所示，谷丙转氨酶在 12 周后开始升高，这表明肝细胞受到了损害在 12 周后已经影响到血液。在图 2b 中，谷草转氨酶相对于谷丙转氨酶的升高有滞后性，它的升高提示肝细胞的损害已经发展到了细胞器水平，在 16 周后，血液中的谷草转氨酶水平升高。AST/ALT 比值变化也与转氨酶一致，如图 2c 所示，在肝细胞开始损伤时，ALT 会增加导致 AST/ALT 比值降低，当肝细胞线粒体受到伤害时，AST 开始增加 AST/ALT 比值又会上升。在 0-12 周时，肝细胞开始损伤，16 周后，肝细胞受到严重破坏。在图 2d 中我们可以发现，在肝癌-炎癌模型中，血液中最敏感的变化来自于碱性磷酸酶（ALP），其在第四周时就已有明显的升高，并且在疾病的进展过程中一直保持着较高的水平。肝脏作为主要的蛋白和白蛋白合成器官，但是在肝癌-炎癌模型中我们可以发现，当肝脏发生损伤病变后，血液中的总蛋白（TP）和白蛋白（ALB）仍处于正常状态，这可能与人体的稳态机制有关，如图 2e 和 2f 所示。

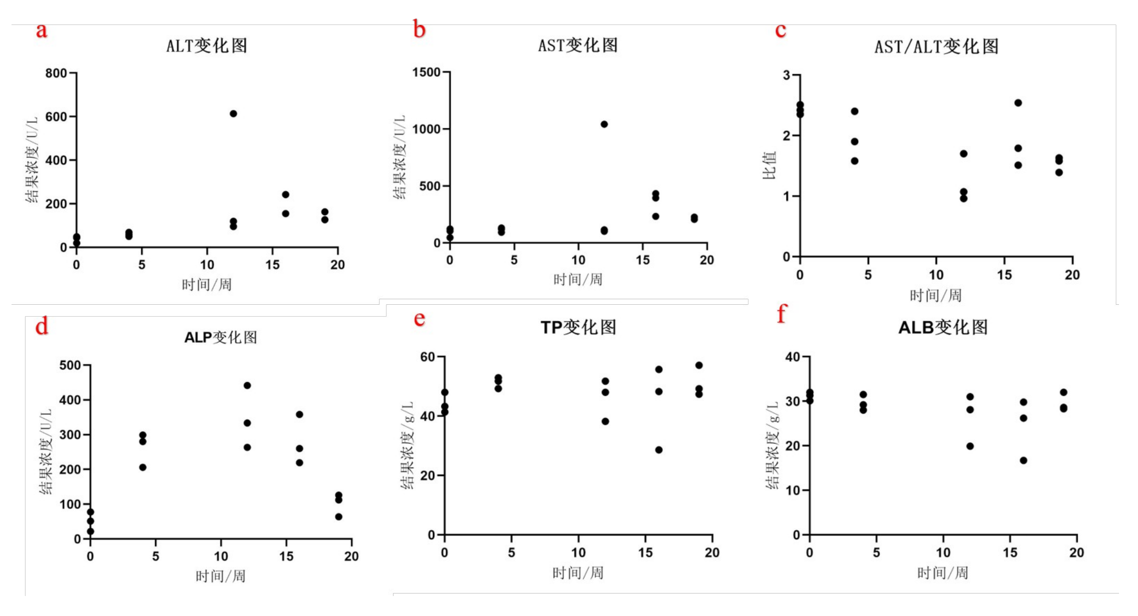


Figure 2. 大鼠肝功结果

3.3 肝脏大体结果分析

为对模型有直观的评估，我们直接观察处于肝癌-炎癌模型不同时期大鼠肝脏的表面观。如图3所示，3a、3b、3c、3d分别对应正常时期、肝炎时期、肝硬化时期、肝癌时期的大鼠肝脏。在健康时期，大鼠肝脏呈淡红色，无纹理，质地柔软到了肝炎时期肝脏颜色会较正常时期偏暗，并且质韧；发展到肝硬化时期，肝脏表面会有非常强的颗粒感，并出现黄白色斑点；当发展到肝癌时期时，肝脏可见暗红色肿块，并且肝脏表面弥漫灰白色结节。

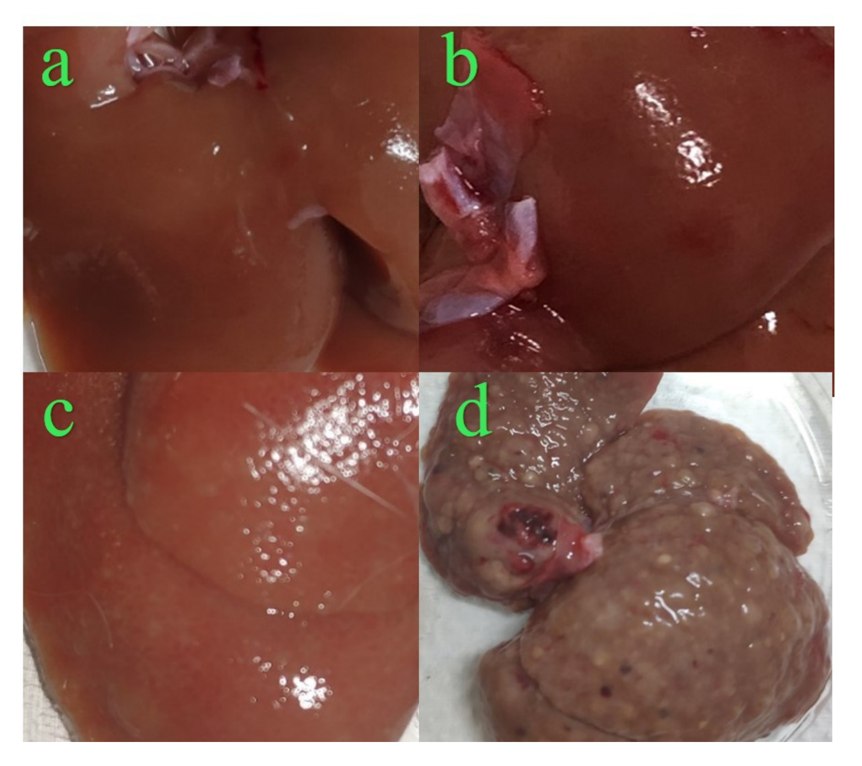


Figure 3. 大鼠肝脏大体图

3.4 病理切片结果分析

正常大鼠的结果如图 4a 所示，肝细胞索呈放射状排列，细胞质均质红染，核圆形居中，汇管区无炎细胞浸润。4 周之后，大鼠切片结果如图 4b，4c 所示，间质及汇管区附近出现炎细胞浸润，呈轻度肝炎状态（4b），部分间质炎细胞浸润较多，呈中度肝炎（4c）。12 周之后，间质区纤维组织增生，炎细胞浸润，假小叶生成，肝脏呈现结节性肝硬化症状（如图 4d）。16-18 周后，组织中可见较大面积的肿瘤组织，肿瘤细胞分化程度较高，排列较规则，少见核分裂现象，广泛可见静脉周围有结缔组织增生，伴有弥散的淋巴细胞浸润呈现肝癌早期症状（如图 4e）。如图 4f 所示，发展到肝癌晚期之后，组织中可见较大面积的肿瘤组织，肿瘤细胞分化程度较低，排列欠规则，多见核分裂现象，可见弥散的肿瘤细胞凋亡，核碎裂或溶解。

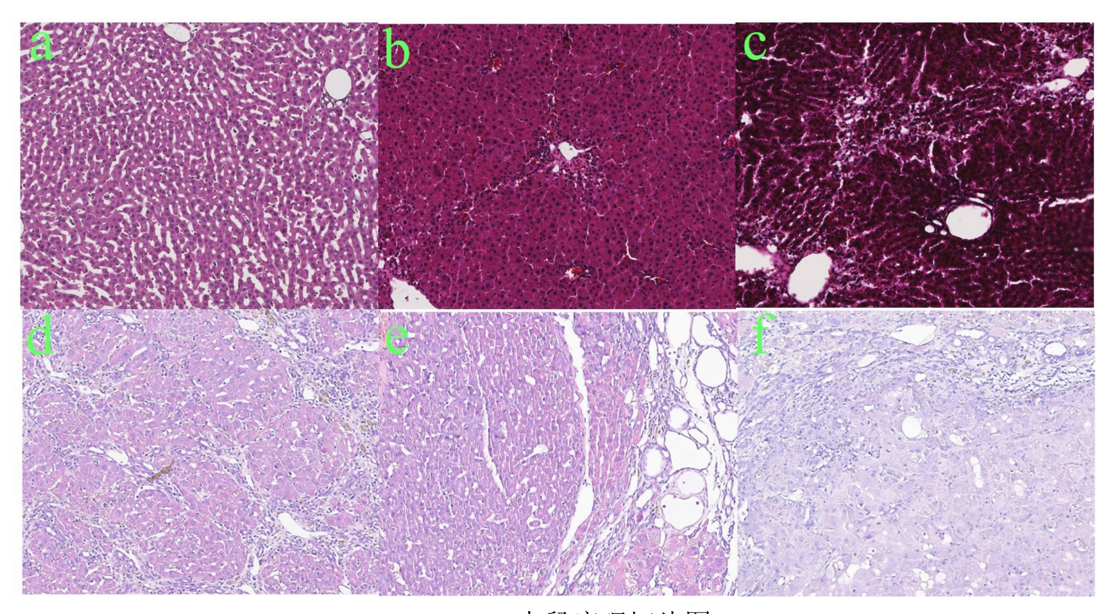


Figure 4. 大鼠病理切片图

3.5 尿液蛋白质组变化分析

（1） 非监督聚类结果分析

为更好地判断大鼠肝癌-炎癌模型中尿蛋白组整体的变化情况，我们对各个大鼠各个时间点进行了非监督聚类，聚类结果如图 5 所示。其中，编号 1-0 代表 1 号大鼠注射二乙基亚硝胺之前，1-4 代表 1 号大鼠注射 4 周药物之后，其余编号同理。其非监督聚类的结果显示，在最后肝癌时期的 7 只大鼠中，其中有 6 只分别是 1，4，5，6，7，9 号大鼠整体其尿蛋白变化情况受疾病影响较为明显；而 3 号大鼠则表现出明显的个体差异。这也提示我们，在疾病模型中，我们有必要注意个体差异带来的影响，我们的精准化医疗需要精准到每一个个体上。在受疾病影响比较明显的 6 只大鼠中，我们发现注射药物前的第 0 周，可以显著的聚集到一起与其他时间点分开；注射药物 4-8 周的时间点会相互交织在一起，这可能与这一时期大鼠处于肝炎时期，由于不同大鼠免疫力不同，所以肝炎的轻重进展也会不同，所以聚集到了一起；注射药物 16 周的时间点有的与注射药物 12 周的时间点聚在一起，有的与注射药物 18 周的时间点聚在一起，这可能也与肝癌-炎癌模型中个体不同导致的疾病进展快慢不同有关，有些大鼠在 12 周发展为肝硬化，有些则是 16 周，有些 16 周发展为肝癌，有些则是需要 18 周。总的来说，尿蛋白非监督聚类的结果虽然有相邻时间点的交错，但整体上把健康大鼠、肝炎大鼠、肝硬化大鼠、肝癌大鼠四个时期进行了区分，并且还提示了我


们，部分个体会有较为明显的个体差异。

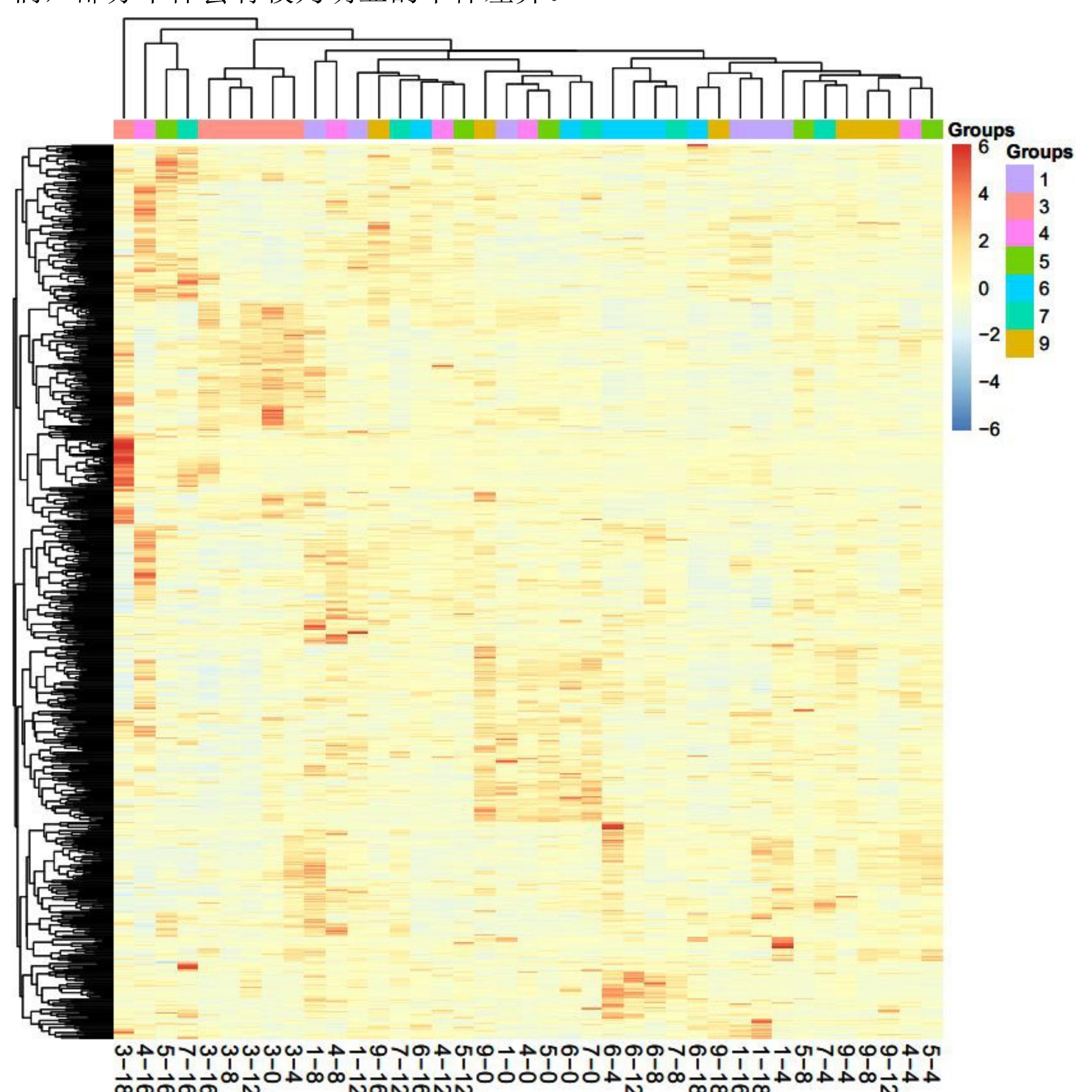


Figure 5. 尿蛋白非监督聚类结果图

（2） 差异蛋白和生物学通路分析

我们为了减少自身对照中生长发育的影响，对 7 只大鼠按照相邻时间点两两比较的方法寻找差异蛋白，7 只大鼠第 4、8、12、16、18 周差异蛋白情况如表 1 所示，其具体 uniprot 信息如补充表 1 所示。我们将得到的差异蛋白通过 Ingenuity Pathway Analysis 软件进行分析，整理了不同样本不同时间点的 IPA 通路情况（如表 2 所示 7 只大鼠部分 IPA 通路，具体通路见补充表 2）。

将 7 只大鼠共有的通路进行统计，最终得到 32 条 IPA 通路，其中多数都与肝癌-炎癌模型疾病的各阶段相关。在这 32 条通路中，有 18 条通路都与肝脏病变相关，其中主要包括三个方面：与肝脏损伤、炎症病变有关；与肿瘤的发生相关；肿瘤潜在的治疗靶点。有 5 条通路涉及到了肝脏的损伤、炎症、病变：外源代谢 PXR 信号通路[14]、α-肾上腺素能信号[15]、LXR/RXR 激活[16]、FXR/RXR 激活[16]、铁稳态信号通路[17]。其中，根据查阅相关文献，外源代谢 PXR 信号通路和 α-肾上腺素能信号与肝脏的损伤和炎症相关，LXR/RXR 激活和 FXR/RXR 激活与肝脏本身的发育和代谢、炎症相关，铁稳态信号通路的出现则与肝纤维化的发生相关。并且这些通路大多在第 4 周和第 8 周就已富集到。有 9 条通路都被文献提到过与肿

瘤的发生相关，其中包括：SPINK1 胰腺癌途径[18]、NRF2 介导的氧化应激反应[19]、谷胱甘肽介导的解毒作用[20]、PXR/RXR 激活[21]、外源代谢 AHR 信号通路[22]、急性期反应信号[23]、糖异生 I[24]、补体系统[25]、网格蛋白介导的内吞信号[26]。它们都被提到与肿瘤甚至是肝癌的发生和发展相关。还有 4 条通路不仅与肿瘤的发生、生长有关，还被提及到可能作为潜在的肿瘤的治疗靶点，包括未折叠蛋白反应[27]、凝血系统[28]、凋亡信号[29]、糖酵解 I[30]。这些潜在的靶点既有涉及肿瘤本身的生长和迁移，也有涉及癌细胞生长、代谢和调亡。

总的来说，我们本次的实验结果表明，我们的尿液蛋白质组可以发现肝癌-炎癌模型各个阶段的变化，这些变化所富集到的生物学过程也都被文献提及与肝炎、肝癌相关。并且由于生物体的个体差异，诱导肿瘤的炎癌模型会出现疾病进展快慢不同的个体差异现象。

Table 1. 7 只大鼠所有时间点差异蛋白情况

大鼠编号	时间点	差异蛋白个数	上调	下调
1	W4	154	81	73
	W8	196	132	64
	W12	156	53	103
	W16	152	30	122
	W18	108	61	47
3	W4	91	55	36
	W8	140	40	100
	W12	86	55	31
	W16	121	71	50
	W18	179	96	83
4	W4	157	65	91
	W8	159	111	48
	W12	137	33	104
	W16	185	109	76
5	W4	111	54	57
	W8	104	45	59
	W12	89	50	39
	W16	161	82	79
6	W4	196	104	92
	W8	149	66	83
	W12	90	49	41
	W16	184	89	95
	W18	142	71	71
7	W4	123	63	60
	W8	92	51	41
	W12	108	49	59
	W16	212	101	111
	W4	100	38	62
	W8	103	47	56

9	W12	56	25	31
	W16	178	114	64
	W18	154	50	104

Table 2. 7只大鼠 IPA 通路

	Ingenuity Canonical Pathways				
	W4	**W8**	**W12**	**W16**	**W18**
1	Unfolded protein response	SPINK1 Pancreatic Cancer Pathway	LXR/RXR Activation	Acute Phase Response Signaling	Glioma Invasivenes s Signaling
	Role of IL-17A in Psoriasis	Acute Phase Response Signaling	FXR/RXR Activation	Tumoricidal Function of Hepatic Natural Killer Cells	Macropinocy tosis Signaling
	Glucocorticoid Receptor Signaling	Gap Junction Signaling	Acute Phase Response Signaling	Cytotoxic T Lymphocyte-mediated Apoptosis of Target Cells	Actin Cytoskeleto n Signaling
	SPINK1 Pancreatic Cancer Pathway	Superpathwa y of Methionine Degradation	Complement System	Iron homeostasis signaling pathway	PXR/RXR Activation
	NRF2-Mediated Oxidative Stress Response	Glutathione Biosynthesi s	Triacylglycerol Degradation	Mitochondrial Dysfunction	Germ Cell-Sertoli Cell Junction Signaling
	Parkinson's Signaling	Remodeling of Epithelial Adherens Junctions	Iron homeostasis signaling pathway	Lymphotoxin β Receptor Signaling	PEDF Signaling
	Mitochondrial Dysfunction	Germ Cell-Sertoli Cell Junction Signaling	Gluconeogenesis I	CD27 Signaling in Lymphocytes	Xenobiotic Metabolism AHR Signaling Pathway
	Sirtuin Signaling Pathway	NRF2-Mediated Oxidative	Glycolysis I	Induction of Apoptosis by HIV1	Leukocyte Extravasati on

		Stress Response			Signaling
	Huntington's Disease Signaling	ERK5 Signaling	2-amino-3-carboxymuconate Semialdehyde Degradation to Glutaryl-CoA	Pyruvate Fermentation to Lactate	LPS-stimulated MAPK Signaling
	Glutathione Redox Reactions I	Ketolysis	Antiproliferative Role of TOB in T Cell Signaling	Eumelanin Biosynthesis	Actin Nucleation by ARP-WASP Complex
3	NRF2-Mediated Oxidative Stress Response	Acute Phase Response Signaling	SPINK1 Pancreatic Cancer Pathway	SPINK1 Pancreatic Cancer Pathway	Acute Phase Response Signaling
	Glutathione Redox Reactions I	LXR/RXR Activation	Oxidative Phosphorylation	Oxidative Phosphorylation	LXR/RXR Activation
	LXR/RXR Activation	FXR/RXR Activation	Huntington's Disease Signaling	Huntington's Disease Signaling	FXR/RXR Activation
	Glutathione-mediated Detoxification	Coagulation System	Retinol Biosynthesis	Retinol Biosynthesis	Coagulation System
	Inhibition of Matrix Metalloproteases	Complement System	G Protein Signaling Mediated by Tubby	G Protein Signaling Mediated by Tubby	Intrinsic Prothrombin Activation Pathway
	SPINK1 Pancreatic Cancer Pathway	Caveolar-mediated Endocytosis Signaling	Apelin Muscle Signaling Pathway	Apelin Muscle Signaling Pathway	Iron homeostasis signaling pathway
	Xenobiotic Metabolism PXR Signaling Pathway	Clathrin-mediated Endocytosis Signaling	Triacylglycerol Degradation	Triacylglycerol Degradation	Complement System
	PXR/RXR Activation	Atherosclerosis Signaling	Lactose Degradation III	Lactose Degradation III	Extrinsic Prothrombin Activation Pathway
	Ceramide Degradation	IL-12 Signaling and	Eicosanoid Signaling	Eicosanoid Signaling	Pyruvate Fermentation to

		Production in Macrophages			Lactate
	IL-15 Signaling	Iron homeostasis signaling pathway	Endothelin-1 Signaling	Endothelin-1 Signaling	Gluconeogenesis I
4	NRF2-Mediated Oxidative Stress Response	Ferroptosis Signaling Pathway	Mitochondrial Dysfunction	SPINK1 Pancreatic Cancer Pathway	
	Apelin Adipocyte Signaling Pathway	Complement System	TCA Cycle II (Eukaryotic)	Coagulation System	
	PXR/RXR Activation	Apoptosis Signaling	Oxidative Phosphorylation	LXR/RXR Activation	
	Xenobiotic Metabolism PXR Signaling Pathway	Acute Phase Response Signaling	Gluconeogenesis I	Acute Phase Response Signaling	
	Acute Phase Response Signaling	LXR/RXR Activation	Glycolysis I	Extrinsic Prothrombin Activation Pathway	
	Unfolded protein response	Glutamine Biosynthesis I	Sirtuin Signaling Pathway	Chondroitin Sulfate Degradation (Metazoa)	
	Glutathione Redox Reactions I	L-cysteine Degradation II	Choline Degradation I	Airway Pathology in Chronic Obstructive Pulmonary Disease	
	Methylthiopropionate Biosynthesis	Glutaryl-CoA Degradation	Xanthine and Xanthosine Salvage	Atherosclerosis Signaling	
	Glutathione-mediated Detoxification	Phagosome Maturation	SPINK1 Pancreatic Cancer Pathway	Superoxide Radicals Degradation	
	Intrinsic Prothrombin	Necroptosis Signaling	Triacylglycerol Degradation	Complement System	

	Activation Pathway	Pathway			
	NRF2-Mediated Oxidative Stress Response	Acute Phase Response Signaling	Coagulation System	Gluconeogenesis I	
	Gap Junction Signaling	LXR/RXR Activation	Acute Phase Response Signaling	Glycolysis I	
	Axonal Guidance Signaling	FXR/RXR Activation	Intrinsic Prothrombin Activation Pathway	Mitochondrial Dysfunction	
5	Circadian Rhythm Signaling	SPINK1 Pancreatic Cancer Pathway	Extrinsic Prothrombin Activation Pathway	LPS/IL-1 Mediated Inhibition of RXR Function	
	Apelin Adipocyte Signaling Pathway	Methylglyoxal Degradation I	LXR/RXR Activation	Acute Phase Response Signaling	
	Gluconeogenesis I	Lysine Degradation II	SPINK1 Pancreatic Cancer Pathway	LXR/RXR Activation	
	Glycolysis I	Lysine Degradation V	FXR/RXR Activation	Glutathione Redox Reactions I	
	Glutathione Redox Reactions I	TR/RXR Activation	Role of Tissue Factor in Cancer	Aspartate Degradation II	
	Sorbitol Degradation I	Airway Pathology in Chronic Obstructive Pulmonary Disease	GP6 Signaling Pathway	Xenobiotic Metabolism AHR Signaling Pathway	
	Glutathione-mediated Detoxification	Atherosclerosis Signaling	Complement System	Superoxide Radicals Degradation	
	SPINK1 Pancreatic Cancer Pathway	Glutathione Biosynthesis	NRF2-Mediated Oxidative Stress Response	Acute Phase Response Signaling	Glycolysis I
	Superoxide	γ-glutamyl	PXR/RXR	LXR/RXR	Gluconeogen

	Radicals Degradation	Cycle	Activation	Activation	esis I
	Intrinsic Prothrombin Activation Pathway	Glycolysis I	Xenobiotic Metabolism PXR Signaling Pathway	FXR/RXR Activation	Pyruvate Fermentation to Lactate
6	Extrinsic Prothrombin Activation Pathway	Gluconeogenesis I	Apelin Adipocyte Signaling Pathway	γ-glutamyl Cycle	NRF2-Mediated Oxidative Stress Response
	NRF2-Mediated Oxidative Stress Response	Glutamine Biosynthesis I	Glutathione Redox Reactions I	Iron homeostasis signaling pathway	PXR/RXR Activation
	Mitochondrial Dysfunction	Complement System	Neuroprotective Role of THOP1 in Alzheimer's Disease	Glutathione Biosynthesis	Xenobiotic Metabolism AHR Signaling Pathway
	NAD Salvage Pathway II	LXR/RXR Activation	Methylthiopropionate Biosynthesis	Atherosclerosis Signaling	Unfolded protein response
	Amyotrophic Lateral Sclerosis Signaling	NRF2-Mediated Oxidative Stress Response	MIF-mediated Glucocorticoid Regulation	Coagulation System	Glutathione Redox Reactions I
	Glutathione Redox Reactions I	FXR/RXR Activation	Glutathione-mediated Detoxification	Complement System	HIF1α Signaling
	Senescence Pathway	Ferroptosis Signaling Pathway	Huntington's Disease Signaling	Hepatic Fibrosis / Hepatic Stellate Cell Activation	Glucocorticoid Receptor Signaling
	Coronavirus Replication Pathway	SPINK1 Pancreatic Cancer Pathway	Hepatic Fibrosis Signaling Pathway	Acute Phase Response Signaling	
	Coronavirus Pathogenesis Pathway	Retinol Biosynthesis	Apelin Adipocyte Signaling Pathway	LXR/RXR Activation	

7	Axonal Guidance Signaling	Triacylglycerol Degradation	Osteoarthritis Pathway	FXR/RXR Activation	
	Neuroprotective Role of THOP1 in Alzheimer's Disease	Pulmonary Healing Signaling Pathway	LXR/RXR Activation	Coagulation System	
	NRF2-mediated Oxidative Stress Response	TCA Cycle II (Eukaryotic)	Endocannabinoid Developing Neuron Pathway	Complement System	
	Methylglyoxal Degradation I	L-cysteine Degradation II	CCR3 Signaling in Eosinophils	Iron homeostasis signaling pathway	
	Hypusine Biosynthesis	Superpathway of Methionine Degradation	Colorectal Cancer Metastasis Signaling	Tryptophan Degradation X (Mammalian, via Tryptamine)	
	SPINK1 Pancreatic Cancer Pathway	Coronavirus Replication Pathway	Phagosome Maturation	Gluconeogenesis I	
	Pentose Phosphate Pathway (Oxidative Branch)	Ferroptosis Signaling Pathway	MYC Mediated Apoptosis Signaling	Ethanol Degradation II	
	Arginine Biosynthesis IV	Sirtuin Signaling Pathway	Axonal Guidance Signaling	Noradrenaline and Adrenaline Degradation	
	SPINK1 Pancreatic Cancer Pathway	Apelin Adipocyte Signaling Pathway	TCA Cycle II (Eukaryotic)	Acute Phase Response Signaling	Role of IL-17A in Psoriasis
	Glucocorticoid Receptor Signaling	G Protein Signaling Mediated by Tubby	Death Receptor Signaling	LXR/RXR Activation	HIF1α Signaling
	Germ Cell-Sertoli Cell	Androgen Signaling	2-ketoglutarate Dehydrogenase	FXR/RXR Activation	Gluconeogenesis I

	Junction Signaling		Complex		
9	Pulmonary Healing Signaling Pathway	IL-1 Signaling	Branched-chain α-keto acid Dehydrogenase Complex	Coagulation System	Glycolysis I
	Sertoli Cell-Sertoli Cell Junction Signaling	Apelin Muscle Signaling Pathway	Apoptosis Signaling	Intrinsic Prothrombin Activation Pathway	LXR/RXR Activation
	Remodeling of Epithelial Adherens Junctions	Axonal Guidance Signaling	Creatine-phosphate Biosynthesis	Complement System	Role of PKR in Interferon Induction and Antiviral Response
	Sirtuin Signaling Pathway	α-Adrenergic Signaling	2-oxobutanoate Degradation I	Extrinsic Prothrombin Activation Pathway	Phagosome Maturation
	Sucrose Degradation V (Mammalian)	Oxytocin Signaling Pathway	Acetyl-CoA Biosynthesis I (Pyruvate Dehydrogenase Complex)	Iron homeostasis signaling pathway	Methylglyoxal Degradation I
	Chondroitin Sulfate Degradation (Metazoa)	Gαs Signaling	Glycine Cleavage Complex	Osteoarthritis Pathway	Hypusine Biosynthesis
	Dermatan Sulfate Degradation (Metazoa)	G Beta Gamma Signaling	Aspartate Degradation II	Role of Tissue Factor in Cancer	Pyruvate Fermentation to Lactate

参考文献:

[1] YouHe Gao. Urine—an untapped goldmine for biomarker discovery?[J]. Science China Life Sciences,2013,56(12).

[2] Thongboonkerd V, McLeish K R, Arthur J M, et al. Proteomic analysis of normal human urinary proteins isolated acetone precipitation or ultracentrifugation. Kidney Int, 2002, 62: 1461-1469.

[3] Yuhang Huan,Weiwei Qin,Youhe Gao.Factors to consider in the verification of urinary biomarkers[J].Science China(Life Sciences),2018,61(10):1283-1290.

[4] Tomasz P Radon1, Nathalie J Massat. Identification of a three-biomarker panel in urine for early detection of pancreatic adenocarcinoma[J]. *Clin Cancer Res*. 2015 August 1; 21(15): 3512–3521.

[5] Virginia Urquidi1, Mandy Netherton. Urinary mRNA biomarker panel for the detection of urothelial carcinoma[J]. *Oncotarget*,2016. Vol. 7, No. 25.

[6] Youhe Gao. Roadmap to the Urine Biomarker Era[A]. 国家外国专家局国外人才资源总库大连人才分库、百奥泰国际会议（大连）有限公司.2015 年第一届国际泌尿医学会议会刊[C].国家外国专家局国外人才资源总库大连人才分库、百奥泰国际会议（大连）有限公司:百奥泰国际会议(大连)有限公司,2015:1.

[7] 刘煌,刘静.肝癌动物模型的研究进展[J].世界华人消化杂志,2011,19(12):1275-1278.

[8] Dr. D. Max Parkin MD,Mr. Freddie Bray,Mr. J. Ferlay,Dr. Paola Pisani PhD. Global Cancer Statistics, 2002[J]. CA: A Cancer Journal for Clinicians,2005,55(2).

[9] Philippa Newell,Augusto Villanueva,Scott L. Friedman,Kazuhiko Koike,Josep M. Llovet. Experimental models of hepatocellular carcinoma[J]. Journal of Hepatology,2008,48(5).

[10] Wisniewski, J.R., et al., Universal sample preparation method for proteome analysis. Nat Methods, 2009. 6(5): p. 359-62.

[11] Armitage, E.G., et al., Missing value imputation strategies for metabolomics data. Electrophoresis, 2015. 36(24): p. 3050-60.

[12] Wang, S., et al., NAguideR: performing and prioritizing missing value imputations for consistent bottom-up proteomic analyses. Nucleic Acids Res, 2020. 48(14): p. e83.

[13] Huang da, W., B.T. Sherman, and R.A. Lempicki, Systematic and integrative analysis of large gene lists using DAVID bioinformatics resources. Nat Protoc, 2009. 4(1): p. 44- 57.

[14] Mutual repression between steroid and xenobiotic receptor and NF-κB signaling pathways links xenobiotic metabolism and inflammation[J]. The Journal of Clinical Investigation, 2006, 116(8):

[15] Lin Jung-Chun,Peng Yi-Jen,Wang Shih-Yu,Lai Mei-Ju,Young Ton-Ho,Salter Donald M,Lee Herng-Sheng. Sympathetic Nervous System Control of Carbon Tetrachloride-Induced Oxidative Stress in Liver through α-

Adrenergic Signaling.[J]. Oxidative medicine and cellular longevity, 2016, 2016:
[16] Yin and Yang Regulation of Liver X Receptor α Signaling Control of Cholesterol Metabolism by Poly(ADP-ribose) polymerase 1.[J]. International journal of biological sciences,2020,16(15):
[17] Changying Li,Yingying Liu,Zheng Dong,Ming Xu,Ming Gao,Min Cong,Sijin Liu. TCDD promotes liver fibrosis through disordering systemic and hepatic iron homeostasis[J]. Journal of Hazardous Materials,2020,395(prepublish):
[18] 赵娜,郑洋,陈丽丽,荆东辉,王华庆.SPINK1 作为肿瘤标志物的临床价值与应用[J].国际肿瘤学杂志,2020,47(07):414-418.
[19] Liu Qian,Zhang Hao,Smeester Lisa,Zou Fei,Kesic Matt,Jaspers Ilona,Pi Jingbo,Fry Rebecca C. The NRF2-mediated oxidative stress response pathway is associated with tumor cell resistance to arsenic trioxide across the NCI-60 panel.[J]. BMC medical genomics,2010,3(1):
[20] Ding Yiming,Dai Yujie,Wu Mengqi,Li Linlin. Glutathione-mediated nanomedicines for cancer diagnosis and therapy[J]. Chemical Engineering Journal,2021,426:
[21] 郭恩爽. HBx 在 HBV 诱发的肝细胞癌中干预 PXR/RXRα 对 CYP3A4 表达调控的机制研究[D].南方医科大学,2014.
[22] Dietrich C, Kaina B. The aryl hydrocarbon receptor (AhR) in the regulation of cell–cell contact and tumor growth[J]. Pergamon Press, 2010.
[23]Rania Dayoub,Leonhard Buerger,Sara Ibrahim,Michael Melter,Thomas S. Weiss. Augmenter of liver regeneration (ALR) exhibits a dual signaling impact on hepatic acute-phase response[J]. Experimental and Molecular Pathology,2017,102(3):
[24]Roh M S,Ekman L,Jeevanandam M,Brennan M F. Gluconeogenesis in tumor-influenced hepatocytes.[J]. Surgery,1984,96(2):
[25]张玲玲,徐蔚然,梁军.补体活化与肿瘤免疫关系的新进展[J].中华检验医学杂志,2017, 40(09):664-666.
[26] Wang Xiaowei, Qiu Yuhan, Wang Mengyan, Zhang Conghui, Zhang Tianshu, Zhou Huimin, Zhao Wenxia, Zhao Wuli, Xia Guimin, Shao Rongguang. Endocytosis and Organelle Targeting of Nanomedicines in Cancer Therapy.[J]. International journal of nanomedicine, 2020, 15:
[27] Obacz J, Avril T, Camila Rubio-Patio, et al. Regulation of tumor–stroma interactions by the unfolded protein response[J]. The FEBS Journal, 2019, 286(2).
[28] Magnus N , D'Asti E , Meehan B , et al. Oncogenes and the coagulation system - Forces that modulate dormant and aggressive states in cancer[J]. Thrombosis Research, 2014, 133 Suppl 2(Suppl):S1-9.
[29] Fulda Simone, Debatin Klaus-Michael. Apoptosis signaling in tumor therapy.[J]. Annals of the New York Academy of Sciences,2004,1028:
[30] Ganapathy-Kanniappan Shanmugasundaram. Targeting tumor glycolysis by a mitotropic agent.[J]. Expert opinion on therapeutic targets,2016,20(1):

作者贡献声明 ：
王云龙、高友鹤：提出研究思路，设计研究方案；
王云龙：进行实验；
王云龙：分析数据；
王云龙：论文起草；
高友鹤：论文最终版本修订。